



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C07D 233/54, A61K 31/415, 7/48	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 94/19325 (43) Date de publication internationale: 1er septembre 1994 (01.09.94)
---	----	--

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR94/00189
(22) Date de dépôt international: 21 février 1994 (21.02.94)
(30) Données relatives à la priorité:
93/02295 22 février 1993 (22.02.93) FR
93/10486 30 août 1993 (30.08.93) FR
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): EXSYMOL
SOCIÉTÉ ANONYME MONEGASQUE [MC/MC]; 4, avenue Prince-Héréditaire-Albert, MC-98000 Monaco (MC).
(71)(72) Déposant et inventeur: BABIZHAYEV, Marc [RU/RU];
Ivanovskaya 20, 74, Moscou, 127434 (RU).
(72) Inventeur; et
(75) Inventeur/Déposant (US seulement): SEGUIN, Marie-Christine [MC/FR]; 3921, avenue des Diablos-Bleus, F-06360 Eze (FR).
(74) Mandataire: BONNEAU, Gérard; Cabinet Bonneau, 7, avenue Gazan, F-06600 Antibes (FR).

(81) Etats désignés: BR, JP, RU, UA, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.

Best Available Copy

(54) Title: COUPLING PRODUCT OBTAINED FROM HISTAMINE AND AN AMINO ACID

(54) Titre: PRODUIT DE COUPLAGE DE L'HISTAMINE ET D'UN ACIDE AMINE

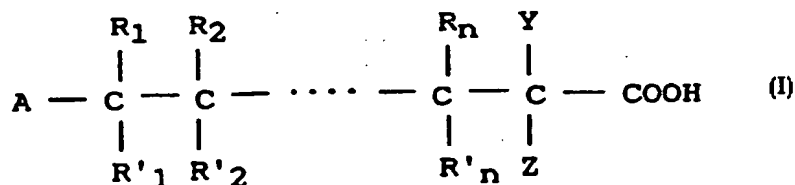
(57) Abstract

The invention relates to a pseudo-dipeptide product obtained by coupling between histamine or methyl-substituted histamine and an amino acid having formula (I), wherein A is a radical selected in the group comprising amine radicals, amides, lactams, urethans; R₁, R'₁, R₂, R'₂...R_n,

R'_n represent each a hydrogen atom, a hydrocarbonic radical or a functional group; Y and Z represent each a hydrogen or a fluorine atom, or a hydrocarbonic radical which may be substituted by one or a plurality of functional groups; and n is an integer higher than or equal to 1; the covalent bond with the histamine or the methyl-substituted histamine being a peptide bond between the carboxylic radical of the amino acid and the amine radical of the histamine. The pseudo-dipeptide products of the invention may be used in therapeutical, cosmetological and agro-alimentary applications and particularly for the treatment of cataract.

(57) Abrégé

L'invention concerne un produit pseudo-dipeptide obtenu par couplage entre l'histamine ou l'histamine méthyl-substituée et un acide aminé ayant pour formule (I), dans laquelle A représente un radical choisi dans le groupe consistant en radicaux amines, amides, lactames, uréthanes; R₁, R'₁, R₂, R'₂...R_n, R'_n représentent chacun un atome d'hydrogène, un radical hydrocarboné, ou un groupement fonctionnel; Y et Z représentent chacun un atome d'hydrogène ou de fluor, ou un radical hydrocarboné pouvant être substitué par un ou plusieurs groupements fonctionnels; et n est un entier supérieur ou égal à 1; la liaison covalente avec l'histamine ou l'histamine méthyl-substituée étant une liaison peptidique entre le radical carboxylique de l'acide aminé et le radical amine de l'histamine. Les produits pseudo-dipeptides de l'invention peuvent être utilisés dans des applications thérapeutiques, cosmétologiques et agroalimentaires et en particulier pour le traitement de la cataracte.



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

PRODUIT DE COUPLAGE DE L'HISTAMINE ET D'UN ACIDE AMINE

La présente invention concerne les produits à base d'histamine et plus particulièrement un produit de couplage entre l'histamine ou l'histamine méthyl-substituée et un acide aminé, son procédé de préparation et ses applications en tant que principe actif sur le plan thérapeutique que cosmétologique, ou comme agent améliorant la stabilité des formulations relevant du domaine thérapeutique, cosmétologique ou agro-alimentaire.

les propriétés biologiques des dipeptides tels que la β -alanyl-histidine sont particulièrement intéressantes dans la mesure où elles contribuent à renforcer les moyens naturels de défense et de réparation de l'organisme. Toutefois, les composés comportant un amino-acide ou plus dans leur structure, tels que la β -Alanyl-histidine, forment une classe de principes actifs généralement bien tolérés par l'organisme mais dont l'efficacité est considérablement réduite par le fait que ces produits sont rapidement dégradés par l'organisme. De plus, bien que la sensibilité aux désactivations enzymatiques soit considérablement réduite pour les très petits peptides (J. Dressman "Opportunities for peptide absorption in the GI tract", Communication GTRV 1992, Paris), la désactivation enzymatique des dipeptides pourrait conduire dans certains cas, à la libération d'histamine. Cette activité "pro-histaminique", associée à la perte d'activité du dipeptide d'origine, n'est pas souhaitable dans le cadre de cette invention.

Par conséquent, le but principal de l'invention est donc de mettre au point des produits peptoïdes proches des dipeptides mentionnés ci-dessus, mais dont l'efficacité n'est pas réduite du fait qu'ils ne sont pas dégradés par l'organisme.

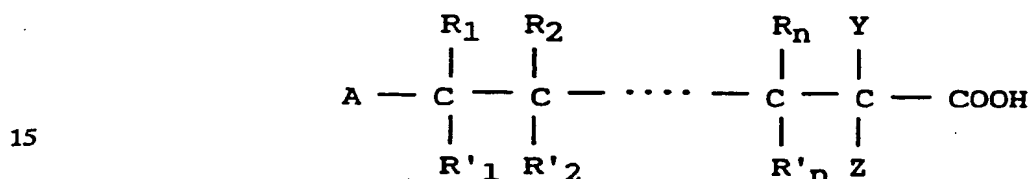
Un autre but de l'invention est de réaliser un produit peptoïde à base d'histamine ayant des propriétés qui renforcent les moyens naturels de défense et de réparation de l'organisme.

Encore un autre but de l'invention est de réaliser un produit peptoïde tel que défini ci-dessus, et dont la

biodisponibilité est améliorée en acétylant l'extrémité aminée.

Encore un autre but de l'invention est de réaliser un produit peptoïde ayant un groupement acétylé tel que défini ci-dessus, de sorte que l'hydrolyse par des enzymes du type acétylpeptide hydrolase permette la libération in situ d'un produit actif par effet retard.

L'objet principal de l'invention est donc un produit pseudo-dipeptide obtenu par couplage entre l'histamine ou l'histamine méthyl-substituée et un acide aminé ayant pour formule:

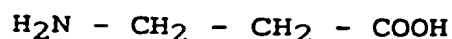


dans laquelle A représente un radical choisi dans le groupe consistant en radicaux amines, amides, lactames, uréthanes, $R_1, R'_1, R_2, R'_2, \dots, R_n, R'_n$ représentent chacun un atome d'hydrogène ou un radical hydrocarboné pouvant être substitué par un ou plusieurs groupements fonctionnels, Y et Z représentent chacun un atome d'hydrogène ou de fluor, ou un radical hydrocarboné pouvant être substitué par un ou plusieurs groupements fonctionnels, et n est un entier supérieur ou égal à 1, la liaison covalente avec l'histamine ou l'histamine méthyl-substituée étant une liaison peptidique entre le radical carboxylique de l'acide aminé et le radical amine de l'histamine.

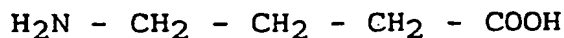
Un autre objet de l'invention est un produit pseudo-dipeptide tel que défini dans l'objet précédent, dans lequel l'atome d'oxygène du groupement carbonyle obtenu lors du couplage de l'acide aminé et de l'histamine, est remplacé par un atome de soufre.

Parmi les acides aminés répondant à la formule de l'invention, les acides aminés suivants donnent les meilleurs résultats:

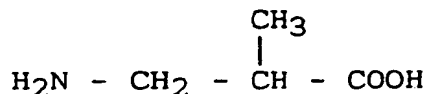
la β -alanine de formule



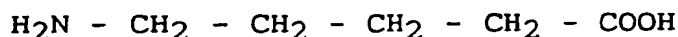
l'acide γ -aminobutyrique de formule



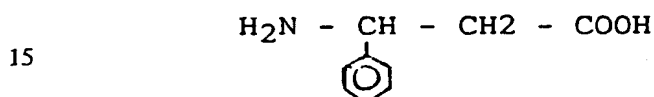
5 l'acide β -aminoisobutyrique de formule



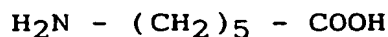
10 l'acide 5-aminovalérique de formule



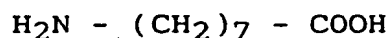
l'acide 3-phényl-3-aminopropionique



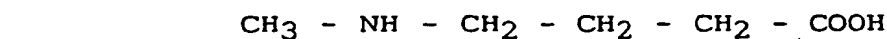
l'acide 6-aminocaproïque



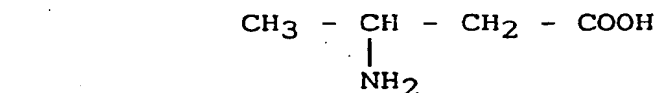
20 l'acide 8-amino-octanoïque



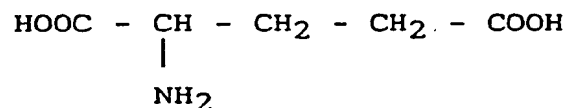
l'acide 4-méthyl-aminobutyrique



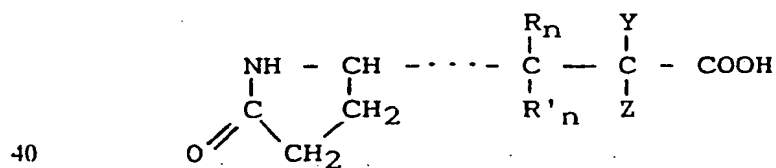
l'acide DL- β -aminobutyrique



30 l'acide L-glutamique



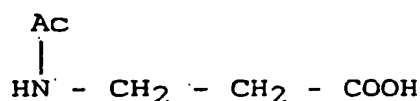
35 les acides aminés dans lesquels on a procédé à la pyroglutamylation du radical NH_2



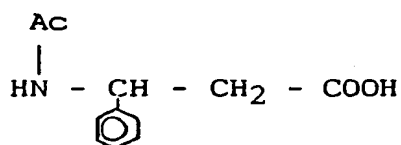
ou les acides aminés suivants dans lesquels l'extrémité aminée a été acétylée. En effet, l'hydrolyse de

ce groupement par des enzymes (du type acétylpeptide hydrolase) permet la libération in situ d'un produit actif par effet retard.

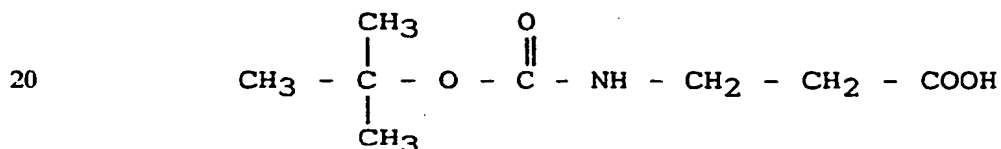
5 l'acide N-acétyl-β-alanine



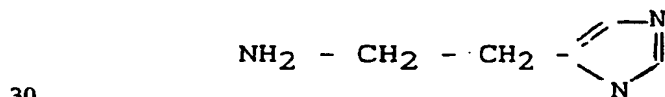
10 l'acide N-acétyl-3-phényl-3-aminopropionique



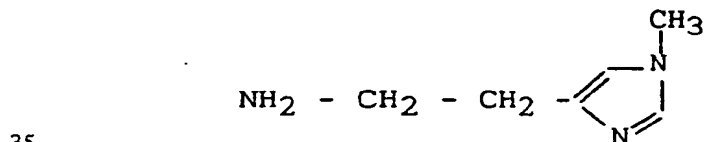
15 l'acide aminé acylé suivant possède en outre des propriétés antioxydantes inhérentes qui renforcent l'activité du produit pseudo-dipeptide selon l'invention



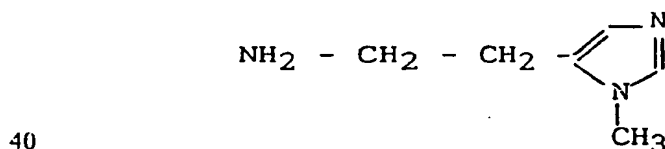
25 Toutefois, la β-alanine est l'acide aminé qui permet d'obtenir un produit pseudo-dipeptide réalisant parfaitement les buts de l'invention. La β-alanine peut être couplée soit à l'histamine de formule



30 soit à la 1-méthyl-histamine ou 1-méthyl-imidoazoléthylamine

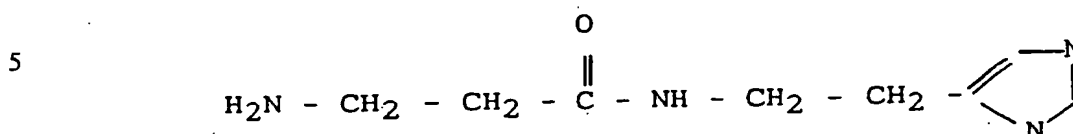


35 soit à la 3-méthyl-histamine ou 3-méthyl-imidoazoléthylamine



40

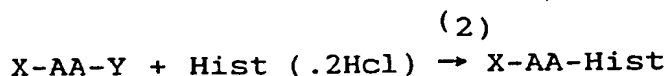
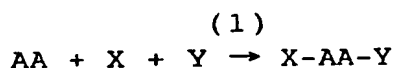
Le produit pseudo-dipeptide préféré dans le cadre de l'invention est la β -alanyl-histamine de formule



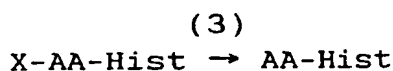
La préparation du produit pseudo-dipeptide selon l'invention peut se faire, soit en utilisant un procédé chimique, soit en utilisant une méthode de synthèse en tout ou en partie enzymatique.

Le procédé de préparation chimique se présente selon le schéma suivant:

15



20



La première étape du procédé consiste à rendre l'acide-amino (AA) N-protégé par un groupement X, et O-activé par un groupement Y.

25

La N-protection est effectuée de préférence par le remplacement d'un atome d'hydrogène dans l'amine de l'acide aminé par le groupement X qui peut être un radical acyl, acyloxy,... Parmi les groupements protecteurs les plus intéressants on peut citer le benzyl-oxycarbonyle, le ter-butyl-oxycarbonyle (BOC), le 9-fluorényl-méthyl-oxycarbonyle (Fmoc), les radicaux benzyle, phthaloyl, 2-nitrophényl-sulfényl, le trifluoro-acétyl, le ter-butyl-oxycarbonyl étant préféré.

30

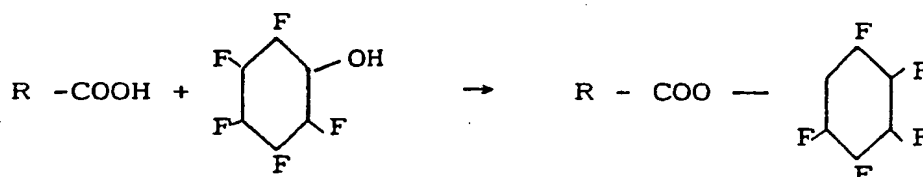
Bien qu'il soit possible de s'en dispenser, l'activation O est une des caractéristiques du procédé d'obtention du produit pseudo-dipeptide selon l'invention. Cette activation réalisée de préférence par estérification de la fonction carboxylique de l'acide aminé par un composé choisi dans le groupe consistant en: alcool de cyanométhyle,

35

o-nitrophénol, 2,4,5-trichlorophénol, p-nitrophénol, 2,4-dinitrophénol, pentachlorophénol, pentafluorophénol, N-hydroxyphtalimide, N-hydroxysuccinimide, 1-hydroxypipéridine et 5-chloro-8-hydroxy-quinoline.

5 Ainsi, si on utilise le pentafluorophénol en tant que groupement Y, la réaction s'écrit, si R - COOH est l'acide aminé selon l'invention

10



15

La deuxième étape du procédé de préparation est le couplage avec l'histamine qui peut se faire avec ou sans agent de couplage, en faisant réagir l'acide aminé N-protégé et O-activé avec l'histamine de préférence sous forme de dichlorhydrate. Il faut noter que l'agent de couplage n'est pas indispensable avec un acide aminé O-activé.

Le couplage sans agent de couplage s'effectue dans un solvant organique (par exemple chloroforme, 1,2-dimethoxyethane, diméthylformamide...) en présence d'acide (par exemple acide acétique...) ou de base (par exemple triéthylamine...) dans un solvant hydro-organique (par exemple eau-pyridine ou eau-1,2-diméthoxyethane...) en présence de base (par exemple soude ou bicarbonate de sodium...) puis d'acide (par exemple acide chlorhydrique...); dans des conditions catalytiques (par exemple imidazole, N-ethylmorpholine...)...

Si un agent de couplage est utilisé, cet agent peut-être par exemple le dicyclohexyl-carbodiimide, le 1-isobutyloxy-carbonyl-2-isobutyloxy-1,2-dihydroquinoline, le carbonyldiimidazole, Woodward Reagent K, α-chlorovinyl ethyl ether, α,α-dichlorodiethyl Ether, dichloromethyl methyl ether, DCC et additifs, DCC-pentachlorophénol, DCC-pentafluorophénol, cyanamide, cetenimines et cétènes, sels

d'oxazolinium, EEDQ ('1-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoléine), ynamines acylphosphoniums, triphénylphosphite et imidazole, complexes de cuivre II, SiCl₄...

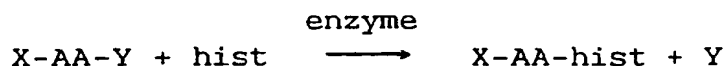
5 Dans la troisième étape, le groupement X ou N-protecteur est éliminé. Cette élimination se fait, selon les groupements protecteurs, par hydrogénolyse, par réduction par le sodium dans l'ammoniac liquide, par hydrazinolyse, par acidolyse, par hydrolyse ou par voie enzymatique. La
10 solution préférée consiste à effectuer cette étape de déprotection par acidolyse par l'acide chlorhydrique dans l'acide acétique. Dans ce dernier cas, le produit pseudo-dipeptide est obtenu sous forme de chlorhydrate, et il faut le traiter par des résines pour recueillir le produit base.

15 A titre d'exemple, le procédé de préparation de la β -alanyl-histamine peut se faire de la façon suivante:

370 mg de chlorhydrate d'histamine (2 mmol) sont dissous dans 7 ml de diméthylformamide (DMF). 0.56 ml de triéthylamine (4 mmol) et 800 mg de N-terbutyloxycarbonyl- β -
20 alanyl-pentafluorophényl-ester (2.25 mmol) sont ajoutés au mélange. Le mélange est agité 30 minutes à 0°C puis 3 heures à température ambiante. Le résidu est filtré puis lavé avec du diméthylformamide. Le diméthylformamide est évaporé sous vide. De l'éther est ajouté au résidu et le composé huileux
25 N-terbutyloxycarbonyl- β -alanyl-histamine est recueilli par décantation. Le chlorhydrate de β -alanyl-histamine est ensuite obtenu par traitement du N-terbutyloxycarbonyl- β -alanyl-histamine par de l'acide chlorhydrique en solution dans l'acide acétique pendant 30 minutes. L'acide acétique
30 est partiellement évaporé sous vide et de l'éther est rajouté au résidu. Le résidu est alors filtré. La recristallisation par le système éthanol/méthanol (50/50) - éther éthylique conduit à l'obtention de 300 mg de chlorhydrate de β -alanyl-histamine. Enfin, la β -alanyl-histamine base est obtenue par
35 passage du chlorhydrate correspondant sur des résines.

La méthode de synthèse enzymatique se fait en utilisant la réaction de couplage suivante, une fois que

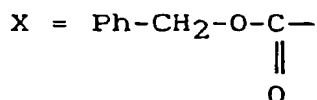
l'acide-amino (AA) est N-protégé (groupement X) et O-activé (groupement Y):



5

Dans le cas présent, la N-protection dont la préparation a déjà été décrite dans le procédé de préparation chimique, permet aussi d'accroître la solubilité de l'acide aminé dans le milieu réactionnel. Ceci peut diriger le choix du groupement X de façon à augmenter la solubilité de l'acide aminé dans les milieux organiques. Ainsi, X est de préférence le radical benzyl-oxycarbonyle

10



15

L'activation O peut se faire par estérification de la fonction carboxylique par un alcool choisi dans le groupe consistant en: alcools aliphatiques, de préférence l'éthanol, les halogéno-alkylalcools tels que le 2,2,2-trichloro-éthanol, les alcools aromatiques tels que le phénol, ainsi que les alcools déjà cités pour le procédé de préparation chimique. Il faut toutefois exclure les alcools tertiaires.

20

La réaction de couplage avec l'histamine base (ou ses dérivés méthylés) ou un sel d'histamine (ou ses dérivés méthylés), par exemple le dichlorhydrate d'histamine, est réalisée dans une variété de solvants organiques tels que les solvants hydrocarbonés aliphatiques (cyclohexane, heptane...) ou aromatiques (toluène), les alcools tertiaires (t-butanol, ter-amylalcool), les halogénures d'alkyle (dichlorométhane), les éthers (isopropyléther), l'acétonitrile, le diméthylformamide ou le diméthylsulfoxyde. Ces solvants peuvent être utilisés seuls ou en association, anhydres ou en présence d'une faible quantité d'eau.

30

La réaction peut être conduite en présence ou non d'une base, telle que la triéthylamine.

35

Le catalyseur enzymatique est une hydrolase (lipase, protéase) d'origine microbienne ou animale ou végétale. Il peut être sous une forme pure ou non purifiée.

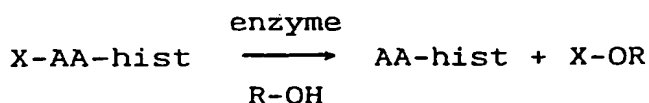
On peut ainsi prendre comme catalyseur les lipases
5 extraites de micro-organismes: *Pseudomonas* sp., *Candida* *Rugosa*, *Mucor*, ou d'origine animale: lipase pancréatique du porc (LPP), des protéases: trypsine, chimotrypsine, subtilisine, papaine...

Le catalyseur, non soluble dans le milieu
10 réactionnel, est dispersé dans le solvant seul ou immobilisé sur un support inerte afin de faciliter son recyclage.

La réaction est effectuée à une température comprise entre 4°C et 70°C, mais de préférence entre 35°C et 45°C sous agitation.

15 Le produit de couplage est recueilli par filtration ou après extraction avec un solvant approprié.

la déprotection et la purification peuvent être réalisées selon la méthode décrite en relation avec le procédé de préparation chimique. Toutefois, cette étape de
20 déprotection peut être réalisée par une réaction enzymatique selon le schéma:



25 où R = H ou un radical alkyle.

Le protocole est similaire à celui décrit pour l'étape de couplage. Toutefois, dans le cas où R = H la réaction est conduite dans l'eau.

Pour l'étape de couplage, il peut être envisagé des
30 solutions moins favorables, mais permettant de réduire les coûts de production de façon importante, en utilisant soit un amino-acide non N-protégé (où X = H), mais O-activé, soit un amino-acide N-protégé, mais non O-activé (où Y = H), soit même l'acide de départ (X = Y = H). Les conditions
35 opératoires sont similaires à celles décrites précédemment pour le cas où l'acide est N-protégé et O-activé.

Dans l'exemple suivant, la N-acétyl-β-alanyl-histamine est préparée comme suit:

- 2,38 g (15 mmoles) de N-acétyl--alanine éthyl ester et 1,11 g (10 mmoles) d'histamine sont dissous dans 40 ml d'un mélange tert-amylalcool-heptane (25:75).

- 0,5 g de lipase Amano P (Pseudomonas sp.) sont
5 ajoutés et la suspension est chauffée à 40°C, sous agitation pendant 48 heures.

La disparition complète d'histamine est vérifiée par HPLC (R.P.C-18-H2O-CH3CN-TFA:99/1/0,1).

Le catalyseur est alors récupéré par filtration. Le
10 solvant organique est évaporé sous vide pour donner un composé huileux. Ce résidu est trituré dans l'éther éthylique afin d'éliminer l'excès de N-acétyl- β -alanine éthyl ester. On obtient 1,9 g de N-acétyl- β -alanyl-histamine.

15 Propriétés pharmacologiques

Comme il a déjà été mentionné, les produits pseudo-dipeptides selon l'invention, peuvent potentialiser certains mécanismes de défense et de réparation de l'organisme. Ils s'opposent
20 ainsi au vieillissement et à la dégénérescence des tissus (oculaires, musculaires, cutanés,...) et ils favorisent la cicatrisation.

Les propriétés anti-oxydantes de ces produits, et plus précisément leur caractère de piègeurs de radicaux
25 libres, et leur capacité à éliminer les produits de peroxydation toxiques pour l'organisme, rendent compte, en partie, des propriétés pharmacologiques observées. La capacité de ces produits à s'opposer au "stress oxydatif", et donc à suppléer aux systèmes de défense anti-oxydative de
30 l'organisme, leur permet d'intervenir dans diverses pathologies. On peut citer leur action anti-inflammatoire, leur rôle de radioprotecteur lors de traitements en radiothérapie, leurs propriétés anti-athérosclérose (inhibition de l'oxydation des LDL), anti-cataracte ou anti-
35 tumorales qui sont maintenant bien documentées.

Comme il a déjà été mentionné, les produits pseudo-dipeptides selon l'invention présentent des propriétés

d'antivieillessement et d'antidégenérescence des tissus cutanés et muqueuses. Ces propriétés sont dues de façon générale à l'activité antioxydante de ces produits, et en particulier aux activités anti-radicaux libres, pseudo-péroxydase, antiréticulation, et de régénération tissulaire qu'ils démontrent.

De plus, de multiples arguments expérimentaux, analytiques et épidémiologiques, militent en faveur de la théorie selon laquelle l'accumulation des dommages biochimiques provoqués par les R.L. constituerait le processus essentiel du vieillissement. Il est notamment clair que l'exposition au rayonnement solaire, responsable de la formation d'espèces radicalaires dérivées de l'oxygène, est une cause du vieillissement cutané prématuré, comme elle est le facteur principal dans la formation de la cataracte dite "sénile".

La plupart des constituants cellulaires représentent en effet des cibles potentielles pour l'attaque des radicaux libres. Les acides gras insaturés entrant dans la composition de phospholipides membranaires sont particulièrement sensibles à leur agression. Leur oxydation conduit à une désorganisation membranaire, à la perte des composants intracellulaires, à la formation d'aldéhydes (toxiques) et de complexes lipoprotéiques (lipofuschine). Les protéines sont également des cibles pour les radicaux libres, et leur attaque conduit à la dénaturation des protéines, à leur coupure. L'altération du tissu conjonctif par les RL est un élément important de leur action destructurante. Les constituants glucidiques sont également attaqués, l'acide hyaluronique est dépolymérisé, les récepteurs membranaires glycoprotéiques sont altérés. Enfin, les acides nucléiques sont des cibles d'une grande importance fonctionnelle.

Une autre caractéristique des produits pseudo-dipeptides selon l'invention rendant compte de la protection des protéines vis-à-vis du "stress oxydatif", est la présence du groupement imidazole de l'histamine. En effet, les phénomènes oxydatifs, responsables de la dégradation des protéines, semblent impliquer tout particulièrement le cycle

imidazole de l'acide aminé histidine (Ref. "Hydroxyl radical mediated damage to proteins with special reference to the cristallins" - Biochemistry, vol.31 (1992), p.4296). Il apparait ainsi que ces composés peuvent jouer un rôle de "leurre" pour les R.L.

Les produits pseudo-dipeptides selon l'invention peuvent s'opposer au "stress oxydatif" à un autre niveau. Ces composés sont capables de réagir, non plus sur l'espèce radicalaire, mais en aval du phénomène oxydatif, sur des sous-produits toxiques, les peroxydes, issus de la réaction des R.L. sur certains constituants cellulaires. Cette activité dite "peroxydase", par analogie avec le nom donné aux enzymes chargées dans l'organisme d'éliminer les peroxydes, permet de neutraliser ces peroxydes et ainsi d'empêcher des réactions en chaîne, qui conduisent notamment à la rupture des membranes cellulaires. On obtient ainsi une activité réparatrice.

Plusieurs tests in vitro ont été réalisés afin de mettre en évidence les différentes propriétés antioxydantes évoquées.

PROTOCOLE décrit par J.M.C. Gutteridge dans Biochemistry Journal, vol 224 (1984), p. 761-767:

-substrat d'oxydation: désoxyribose,
-système de production d'anions superoxydes: xanthine oxydase/hypoxanthine,
-détection: acide thiobarbiturique/malondialdéhyde (MDA)

	% inhibition
Témoin	0
L-carnosine (10mM)	37
β -alanyl-histamine(10mM)	49

Cette activité s'exerce également pour la protection des phospholipides membranaires. Les radicaux libres oxygénés réagissent avec les phospholipides pour former des produits

instables qui, en se dégradant, entraînent la rupture de la membrane cellulaire.

Les tests suivants illustrent cette action.

5

PROTOCOLE 1

-substrat d'oxydation: liposomes de phosphatidylcholine

-système de production de radicaux libres: Fe/acide ascorbique,

10

-détection: acide thiobarbiturique (TBA)/malondialdéhyde (MDA)

Protocole décrit dans "Anti-oxydant activity of L-carnosine, a natural histidine-containing dipeptide in cristallin lens".

15

Biochem. Biophys. Acta (1989), vol 1004, p.363-371.

	η mol MDA mg phospholipides	% d'inhibition
Témoin(sans inhibiteur)	4,4	0
β -alanyl-histamine(10mM)	2,5	42
Carnosine(10mM)	2,0	53
Histamine(10mM)	6,8	-63
Histamine 1 μ M	6,4	-45
Histidine 1mM	6,6	-48

20

PROTOCOLE 2:

-substrat d'oxydation: acide linoléique (0,25 mg/ml),

-système de production de radicaux libres: Fe/acide ascorbique,

-détection: acide thiobarbiturique (TBA)
/malondialdéhyde (MDA).

25

	η mol MDA/ mg acide linoléique	% d'inhibition
Témoin(sans inhibiteur)	7,95	0
β -alanyl-histamine(25mM)	4,25	47
Carnosine(25mM)	3,24	59
Imidazole(25mM)	6,95	11
β -alanine(25mM)	7,91	0
Histamine(25mM)	10,15	-32
β -alanine(25mM) + histamine(25mM)	9,06	-15

L'activité du type peroxydase des produits pseudo-dipeptides de l'invention s'exerce par la réduction des peroxydes de type L-OOH résultant de l'attaque des lipides membranaires par des radicaux oxygénés. Ces formes peroxydées peuvent se fragmenter, entraînant la rupture de la membrane cellulaire. Ce mode d'action est complémentaire de l'activité antiradicalaire permettant ainsi une désactivation particulièrement efficace du processus de dégradation des membranes biologiques. Ce mode d'action est appelé "activité peroxydase" par analogie avec certaines enzymes (catalases, glutathione-péroxydase) qui agissent sur le peroxyde d'hydrogène.

Un produit pseudo-dipeptide selon l'invention tel que la β -alanyl-histamine inhibe la réaction

$L-OOH \rightarrow$ produits de dégradation (tétradiènes, cétondiènes),

en réduisant le peroxyde

$L-OOH \rightarrow L-OH$

Des tests effectués avec des composés peroxydés tels que le 13-monopéroxyde d'acide linoléique ou les hydropéroxydes de phosphatidylcholine montrent qu'un produit pseudo-dipeptide selon l'invention, la β -alanyl-histamine se comporte de façon comparable à la β -alanyl-histidine ou carnosine. Le comportement réducteur biologique de ce produit a été comparé à un agent réducteur chimique, le borohydrure

de sodium qui inhibe la réaction de dégradation de façon identique.

Les tests suivants illustrent cette activité

5 PROTOCOLE 1

L'évolution des lipides peroxydés est évaluée à l'aide de 3 méthodes:

1°) mesure spectrophotométrique à 233 nm,

$\epsilon = 2,8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

10 (O.S. Privett, C. Nickell, W.O. Lundberg, and P.D. Bayer, dans J. Am. Oil Chem. Soc, Vol 32 (1955), p.505-511.

2°) Dosage iodométrique: méthode de M. Hicks et J.M. Gebicki, Analytical Biochemistry vol 99 (1979) p 249-253.

15 3°) chromatographie sur plaque silicagel (hexane/éther/acide acétique 8/7/0,1).

	Activité "péroxydase" nmol de L-OOH réduites/heure
Témoin (a)	36,7 ± 14,7
β -alanyl-histamine(10mM)(b)	138,1 ± 18,7
β -alanyl-histamine(20mM)(b)	187,5 ± 15,7
NaBH ₄ (10mM) (c)	312,5 ± 14,5

20 (a) 13-monopéroxyde d'acide linoléique 0,5 mM sans agent réducteur (préparation selon la méthode de H.W. Gardner (1975) Lipids, vol 10, p.248-252).

(b) activité entièrement inhibée par l'addition de 0,5 mM de EDTA.

(c) agent réducteur chimique.

25

PROTOCOLE 2

L'activité type "péroxydase" a également été évaluée sur un modèle "liposome". Les hydroperoxydes de phosphatidylcholine (PC-OOH) sont préparés selon un protocole
30 similaire à celui déjà décrit pour le monopéroxyde d'acide linoléique.

La réduction des formes peroxydes est suivie en dosant les peroxydes restants selon une méthode établie (Hicks M and Gebicki J.M (1979), Anal. biochem., vol 99 p 249-253.

5

	Nb moles de PC-OOH réduites/Nb moles de PC total x heure
β -alanyl-histamine(10mM)	$0,77 \times 10^{-3}$
L-carnosine(10mM)	$3,16 \times 10^{-3}$
β -alanyl-histamine(25mM)	$1,56 \times 10^{-3}$
L-carnosine(25mM)	$3,65 \times 10^{-3}$

On s'aperçoit, à la lecture des tests ci-dessus que, dans certains cas, la L-carnosine donne des résultats supérieurs à la β -alanyl-histamine. Cependant, la désactivation enzymatique au niveau cutané de la L-carnosine ne permet pas d'espérer d'aussi bons résultats in-vivo.

Les pseudo-dipeptides selon l'invention peuvent agir plus en aval encore du phénomène de "stress oxydatif", par leur effet "anti-lipofushine". On l'a vu, la peroxydation des acides gras, et en particulier des phospholipides, conduit à leur fragmentation. Ces sous-produits de fragmentation sont toxiques, ils provoquent la réticulation des protéines. Les complexes lipoprotéiques pigmentés qui sont formés sont appelés "lipofushines"

La peroxydation des acides gras par les radicaux libres ne détruit pas seulement ces acides mais inactive les protéines avec formation de polymères "cross-linked". ce processus qui se fait au détriment à la fois des enzymes et des organites cellulaires, est considéré pour jouer un rôle dans le processus de vieillissement. Ces polymères dérivés d'une liaison croisée entre des acides gras polyinsaturés et des protéines sont appelés lipofuscines.

Les pseudo-dipeptides de l'invention fournis pour renforcer les défenses naturelles de l'organisme permettent de limiter la détérioration des protéines par ce processus en

réduisant significativement la formation des complexes lipoprotéiques.

Un autre mode d'action des produits pseudo-dipeptides selon l'invention repose sur leurs propriétés anti-glycation, c'est-à-dire leurs capacités à inhiber la condensation spontanée entre les résidus aminés des protéines et les sucres réducteurs, et principalement le glucose.

La suite de réactions chimiques qui s'ensuit, était connue depuis des dizaines d'années par les chimistes de l'alimentation sous le nom de réaction de Maillard. Elle entraîne une accumulation de liaisons irréversibles entre les protéines, dont le nombre augmente avec l'âge. Il se forme des "liaisons croisées" entre des protéines telles que le collagène ou l'élastine (Ref.K. Reiser, R.J. McCormick, and R.B. Rucker - "Enzymatic and nonenzymatic cross-linking of collagen and elastin" - FASEB Journal, vol.6 (1992), p.2439-3449), avec pour conséquence, un raidissement et une rigidification des tissus, phénomènes caractéristiques des tissus vieillissants. Ce phénomène concerne surtout les protéines à longue durée de vie (protéines du cristallin, collagène, myéline), il est également responsable de la "cataracte du diabétique", individu chez qui la formation de protéines réticulées est fortement accélérée.

L'action antiglycation est due au fait que les produits pseudo-dipeptides selon l'invention sont des composés nucléophiles aminés qui s'opposent à la réticulation des protéines par les sucres, en intervenant au niveau des intermédiaires de la réaction de Maillard (voir plus haut). Dans les produits de l'invention c'est une amine nucléophile stériquement peu encombrée qui confère cette propriété.

Enfin, l'activité de régénération cellulaire dans le processus de cicatrisation a été démontré pour les produits pseudo-dipeptides selon l'invention. En effet, le processus de cicatrisation comporte trois phases: une phase vasculaire et inflammatoire, une phase proliférative ou il se produit une prolifération des fibroblastes et une néosynthèse du collagène, et une phase de remodelage au cours de laquelle il se produit un équilibre entre collagénolyse et biosynthèse.

Dans ce processus, les produits pseudo-dipeptides agissent en tant qu'agents chimiotactiques ou activateurs qui provoquent l'arrivée vers le foyer cicatriciel des cellules participant à la reconstruction des tissus.

5 Un test de mise en évidence de l'activité d'un produit pseudo-dipeptide selon l'invention, la β -alanyl-histamine, sur la réparation du tissu conjonctif cutané a été pratiqué chez le rat. Cette expérimentation a été effectuée sur un lot de 12 rats Wistar. Une incision d'une longueur de
10 12 mm impliquant en profondeur l'ensemble épiderme et derme. A la fin de la cicatrisation les rats ont ensuite été traités quotidiennement par application topique de la β -alanyl-histamine pendant trois semaines. En même temps, un lot témoin de 12 rats a été traité avec un placebo pendant la
15 même durée d'expérimentation.

 Après les 3 semaines d'expérimentation, un prélèvement du tissu cicatriciel a montré que la cicatrice est peu ou pas visible en surface. L'épiderme est bien reconstitué. les couches cornées sont identiques à celles de
20 l'épiderme normal voisin. Elles montrent un aspect variable suivant que l'on considère les animaux témoins ou les animaux traités.

 La zone dermique en voie de cicatrisation apparaît comme une bande relativement étroite s'étendant de l'épiderme
25 à la couche musculaire. La limite avec la zone non lésée est nette, sans aspect de transition. La densité et l'aspect des éléments du tissu conjonctif sont sensiblement les mêmes dans la couche capillaire et dans la couche profonde. Cependant, les fines fibres élastiques ou de réticuline sont
30 généralement plus nombreuses dans les couches dermiques superficielles. La substance fondamentale est plus abondante que normalement comme le montrent les colorations par le bleu de toluidine (métachromasie à pH acide et technique de Lissberg).

35 Par contre les rats du lot témoin présentent un épiderme avec bourrelet cicatriciel d'une épaisseur supérieure à la normale. On note une hyperplasie fibroblastique et néovasculaire sur l'ensemble de la région

cicatricielle. Les fibroblastes sont en outre modérément hypertrophiés. Quelques rares faisceaux collagènes épais peuvent s'observer, mais la plus grande partie des faisceaux sont courts et d'épaisseur moyenne.

5 Selon un autre mode d'action, les produits pseudo-dipeptides selon l'invention favoriseraient la cicatrisation en agissant sur les cellules du système immunitaire impliquées à un stade précoce dans la cicatrisation (lymphocytes, mastocytes, monocytes) et dont le rôle principal est la sécrétaion des facteurs de croissance.

10 Ce pouvoir "immunostimulateur" est mis en évidence à l'aide d'un test in vitro sur splénocytes murins. Le protocole est extrait de : J. Kunert-Radek, H. Stepien, K. Lyson et M. Pawlikowski - "Effects of calcium channel
15 modulators on the proliferation of mouse spleen lymphocytes in vitro" - Agents and Actions, vol.29, Nos 3-4 (1990), p. 254-258.

20 La prolifération cellulaire est suivie par la mesure du taux d'incorporation de thymidine tritiée dans les cellules, exprimé en nombre de désintégrations par mn, déduites du bruit de fond.

Les résultats obtenus avec un immunostimulant de référence, la concanavaline A, sont donnés à titre de comparaison.

25 L'effet immunostimulateur est exprimé par un Index de Stimulation (IS).

$$\text{IS} = \frac{\text{Nb de désintégrations par mn d'une suspension cellulaire additionnée de composé mitogène}}{\text{Nb de désintégrations par mn d'une suspension cellulaire de référence sans mitogène}}$$

30

Les valeurs correspondent à la moyenne de trois mesures.

On observe un effet immunostimulateur maximal pour une concentration de 25µg/ml en 8-alanylhistamine. En conclusion,
35 on observe un effet immunostimulateur (prolifération cellulaire) modéré pour ce pseudo-dipeptide pour des concentrations comprises entre 5 et 25 µg/ml.

FEUILLE RECTIFIEE (REGLE 91)
ISA/EP

	Concentration Immunomodulateur ($\mu\text{g/ml}$)				
	2,5	5	10	25	50
IS(β -alanyl-histamine)	4,8	15,7	16,9	18,6	12,8
IS (concanavaline A)	4,8	25.1	20.5	12,6	

Cette activité est comparable à celle d'un mitogène
5 de référence, la concanavaline A.

Les produits pseudo-dipeptides selon l'invention
peuvent participer à la protection de l'organisme contre les
réactions allergiques, et notamment s'opposer au choc
anaphylactique, en exerçant une activité régulatrice de la
10 réponse immunitaire.

Ce type de produit agirait également en s'opposant à
l'augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins,
responsables de l'oedème et par un effet antagoniste vis-à-
vis de la bradykinine, un effecteur de la réaction
15 oedémateuse (Ref. K. Nagai Ed. - "Studies of carnosine and
related chemicals on the physiology of wound repair
mechanism", pages 24-26, Tokyo (1976)). c'est le caractère
anti-histaminique potentiel de cette famille qui jouerait un
rôle dans cette propriété.

20

Applications thérapeutiques et cosmétologiques

L'ensemble des propriétés énoncées ci-dessus, dont la
caractéristique essentielle est de participer au renforcement
25 des moyens naturels de défense et de réparation de
l'organisme conduit à des applications thérapeutiques et
cosmétologiques appréciables des produits pseudo-dipeptides
selon l'invention.

Les propriétés antioxydantes des pseudo-dipeptides
30 selon l'invention permettent de proposer ces produits pour le
traitement des pathologies associées au "stress oxydatif".

Une application thérapeutique importante est le
traitement de la cataracte. Les causes des différentes
cataractes sont diverses. Les mécanismes impliqués dans ces

FEUILLE RECTIFIEE (REGLE 91)
ISA/EP

pathologies, qu'elles soient du type "cataracte sénile" ou "cataracte du diabétique" sont regroupés en deux catégories: les mécanismes oxydatifs (M. A. Babizhayev, A.I. Deyev, L.F. Lindberg, "Lipid peroxidation as a possible cause of cataract", Mechanisms of Ageing Dev., Vol 44 (1988); P. 69-89), et les mécanismes de réticulation du type glycation (T.J. Lyons, G. Silvestri, J.A. Dunn, D.G.Dyer, J.W. Baynes "Role of glycation of lens crystallins in diabetic and non-diabetic senile cataracts", Diabetes Vol. 40, N° 8, (1991), P. 1010-1015).

Comme on l'a vu précédemment, les propriétés antioxydantes des pseudo-dipeptides s'exerçant en particulier par leur activité anti-radicaux libres et type "péroxydase" et également leur activité anti-glycation, font des produits pseudo-dipeptides selon l'invention des produits efficaces pour soigner la cataracte.

Les produits pseudo-dipeptides selon l'invention peuvent s'opposer aux phénomènes oxydatifs responsables de l'athérosclérose. Dans cette pathologie, l'oxydation de particules lipoprotéiques de faible densité (LDL) circulant dans le sang est responsable de la fragmentation de la partie protéique (apoprotéine B) comme de la fraction lipidique de ces particules. Les fragments formés induiraient l'apparition de formes cellulaires anormales (monocytes et macrophages chargés en cholestérol) capables de s'agréger sur les parois des vaisseaux sanguins et de former la plaque d'athérome.

Les produits pseudo-dipeptides selon l'invention seraient de plus, particulièrement adaptés au traitement de cette maladie dans la mesure où il a été mis récemment en évidence que des phénomènes de glycation sont également impliqués dans la genèse de la plaque d'athérome (Ref. T.J. Lyons - "Glycation and oxidation - A role in the pathogenesis of Atherosclerosis" - American Journal of Cardiology, vol.71, N° 6 (1993), p. 1326-1331).

Les produits pseudo-dipeptides selon l'invention peuvent également s'opposer au processus de cancérogénèse dans la mesure où il a été démontré que les espèces radicalaires dérivées de l'oxygène sont responsables de la

coupure ou de la modification des brins d'ADN, ces transformations pouvant être à l'origine de l'évolution des cellules saines en cellules cancéreuses.

De même, les propriétés antioxydantes des produits pseudo-dipeptides selon l'invention permettent d'indiquer ces produits pour le traitement des états inflammatoires pathologiques, et en particulier pour le traitement de l'arthrite rhumatisante. En effet, la détérioration du liquide synovial est un symptôme caractéristique de l'arthrite de type inflammatoire et on a pu montrer que la dégradation d'un de ses constituants essentiels, l'acide hyaluronique, était dû à un "stress oxydatif". Des études plus récentes (Ref. B. Halliwell and J.M.C. Gutteridge - "Chronic inflammation and the auto immune diseases" - Free Radicals in Biology and Medicine - B. Halliwell and J.M.C. Gutteridge Eds - Clarenton Press (1989), Oxford, p. 422-438) ont également mis en cause des phénomènes de peroxydation lipidique mis en jeu dans ce processus et qui expliqueraient l'action bénéfique des produits selon l'invention.

Les propriétés antioxydantes des produits pseudo-dipeptides selon l'invention peuvent également être exploitées en traitement annexe d'une radiothérapie. Cet effet radioprotecteur, déjà connu pour la B-alanyl-histidine repose sur les propriétés cytoestimulantes de ce type de composé, notamment vis-à-vis des cellules de la moelle osseuse, très sensibles aux rayonnements utilisés en radiothérapie.

Selon des données récentes, certains symptômes épileptiques pourraient provenir de lésions provoquées par les radicaux libres oxygénés sur certaines régions du cerveau (Ref. G.R. Jackson, K. Werrbach-Perer, J.R. Perez-Polo - "Role of nerve growth factor in oxidant-antioxidant balance and neuronal injury - II - A conditioning lesion paradigm" - Journal of Neuroscience Research, vol.25, N°3 (1990), p.369-374). Le pouvoir régénérant des tissus (nerveux en l'occurrence) des produits de l'invention est un élément important dans cette pathologie associée à une dégénérescence du tissu nerveux. Ces produits pourraient également être

indiqués pour le traitement de la maladie de Parkinson dans laquelle serait impliqué un "stress oxydatif" touchant le tissu cérébral.

5 Au niveau de la peau, les propriétés antioxydantes des produits pseudo-dipeptides de l'invention peuvent être exploitées pour neutraliser les effets des espèces radicalaires oxygénées générées par le rayonnement lumineux. Ils s'opposeront ainsi efficacement aux réactions photo-allergiques (les espèces radicalaires induisent au niveau de
10 la peau la formation de molécules allergisantes). En association avec un principe actif sensible à l'oxydation (ex: Chlorpromazine), ils préviendront sa transformation en un composé toxique.

 Ce principe trouve sa meilleure application lors des
15 traitements par photochimiothérapie de certaines maladies de la peau. En effet ces traitements reposent sur l'utilisation d'un photosensibilisant (ex: psoralène) qui, sous l'effet d'un rayonnement, exerce une action bénéfique (interaction avec l'ADN), mais qui, malheureusement, s'accompagne de la
20 formation d'espèces radicalaires, responsables d'effets secondaires indésirables.

 Les produits de l'invention peuvent également être indiqués pour s'opposer à l'apparition de symptômes cutanés chez des individus souffrant de porphyrie, car les
25 porphyrines potentialisent les dommages occasionnés par les R.L.

 Ils pourront également s'opposer à la formation de lésions cutanées liée au "stress oxydatif" chez les personnes souffrant de maladies autoimmunes tel que le Lupus
30 Erythémateux Chronique (SLE).

 Ils s'opposeront également efficacement aux effets du "coup de soleil": érythèmes, oedèmes et formation de cellules caractéristiques au niveau de la peau.

 Les propriétés antioxydantes des composés selon
35 l'invention peuvent bien sûr être utilisées pour la prévention du vieillissement cutané. Les arguments théoriques et expérimentaux qui justifient cette approche ont déjà été donnés précédemment.

Enfin, il a été démontré expérimentalement que ces composés s'opposaient à d'autres phénomènes caractéristiques du tissu cutané vieillissant :

- 5 - La réticulation non-enzymatique de protéines telles que le collagène ou l'élastine par les sucres (V.M. Monnier - "Nonenzymatic glycosylation, the Maillard reaction and the aging process" - Journal of Gerontology, vol. 45, N°4 (1990), p. B105-111),
- 10 - La formation de complexes lipoprotéiques (lipofushines).

Une autre série d'applications relève des propriétés cyto stimulantes des produits pseudo-dipeptides selon l'invention et, comme il l'a été démontré, de leurs
15 propriétés immunostimulatrices. Ces propriétés permettent de favoriser la régénération tissulaire et la cicatrisation, et d'une manière générale, de réguler les fonctions faisant intervenir les effecteurs de la réponse immunitaire.

Ils peuvent ainsi être utilisés pour favoriser la
20 régénération des tissus conjonctifs cutanés perturbés. Ils favorisent la réparation des muqueuses après brûlures ou après traitements chimio et radiothérapiques.

Selon ce principe, ces produits peuvent également être indiqués pour la prévention et le traitement des rides.

25 Les propriétés cyto stimulantes et régénératrices des peptoïdes s'exercent tout particulièrement vis à vis des tissus musculaires où l'on rencontre des concentrations élevées d'un dipeptide naturel apparenté, la β -alanyl-histidine. Bien que le rôle physiologique de ce composé n'est
30 pas, à l'heure actuelle, parfaitement établi, il est étroitement lié au métabolisme musculaire. Ainsi, les produits de l'invention pourraient participer à l'amélioration de la contractilité des muscles, réguler la contraction cardiaque. On peut également utiliser ce type de
35 propriétés pour le traitement de certaines dégénérescences musculaires telles que la myodystrophie de Dushen.

Les propriétés cicatrisantes des produits pseudo-dipeptides selon l'invention trouvent leur application dans de nombreux

domaines. On peut citer le traitement des ulcères gastriques, pour lequel un produit dipeptide apparenté à la carnosine, a donné de bons résultats (M. Ito, T. Tanaka and Y. Suzuki - "Effect of N-(3-aminopropionyl)-L-histidinato zinc (Z-103) on healing and hydrocortisone-induced release of acetic acid ulcers in rats with limited food-intake-time" - Japanese Journal of Pharmacology, vol.54 (1990), p.513-521). En outre, les propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires des produits de l'invention sont utiles pour le traitement de cette pathologie.

Les propriétés cicatrisantes des produits pseudo-dipeptides selon l'invention sont également particulièrement indiqués pour le traitement des atteintes cornéennes. Ils pourront être administrés en traitement post-opératoire, après incision de la cornée pour la correction de la myopie, par exemple.

Ils peuvent également être avantageusement utilisés pour le traitement des pathologies de "l'oeil sec" en favorisant la cicatrisation de l'épithélium cornéen mais également grâce à un comportement de "larme artificielle": protection des tissus lésés contre le "stress oxydatif" (état, inflammation, rayonnement U.V.), incorporation dans des formulations favorisant la restauration du film lacrymal.

Des compositions contenant les produits pseudo-dipeptides de l'invention pourront aussi, de par leur action immunostimulante et régénératrice des tissus, s'opposer aux phénomènes de dégénérescence rétinienne. Ils verront leurs effets renforcés par le fait qu'une composante "stress oxydatif" intervient dans cette pathologie (Ref. R.E. Anderson, L.M. Rapp, R.D. Wiegand - Current Eye Research, vol.3 (1984), p.223-227).

Une autre application importante des produits pseudo-dipeptides de l'invention est plus spécifiquement en relation avec leurs propriétés immunomodulatrices. Il pourrait ainsi être particulièrement bénéfique d'inclure les produits pseudo-dipeptides selon l'invention dans les parfums et déodorants afin de s'opposer aux réactions allergiques, et en

particulier aux chocs anaphylactiques, provoqués par certaines compositions fortement odorantes.

Applications comme stabilisant et conservateur

5

L'excellente tolérance vis-à-vis des pseudo-dipeptides selon l'invention, et leurs propriétés antioxydantes et cytot stimulantes modérées permettent de proposer ces produits pour la conservation et la protection
10 de substances sensibles à l'oxydation, de matières alimentaires ou d'organes et de tissus conservés ex vivo.

On peut citer la prévention de l'oxydation des liposomes afin d'améliorer leur stabilité et d'éviter la formation de sous-produits toxiques, la protection de l'acide
15 hyaluronique incorporé dans des formules cosmétiques contre l'action dépolymérisante des radicaux libres, la protection des huiles et des produits alimentaires oxydables, de produits diététiques.

Les produits de l'invention permettent d'améliorer la
20 conservation des vaccins du sang et du serum, la préservation d'organes voués à la transplantation (avec une référence particulière pour le cœur).

Les applications des produits pseudo-dipeptides de
25 l'invention ont été mises en évidence dans les exemples suivants qui donnent les doses et les formes administrables des produits utilisés comme médicaments ou comme agents stabilisants.

30 Exemple 1

Cet exemple concerne l'utilisation de la β -alanyl-histamine pour soigner des patients atteints de cataracte.

L'étude a été conçue comme une évaluation prospective des modifications de l'opacité du cristallin chez les
35 patients atteints de la cataracte. Tous les patients ont subi un examen ophtalmique initial. celui-ci incluait l'établissement de l'historique médical du patient, une mesure de l'acuité visuelle à correction maximale, des

ophtalmoscopies directes et indirectes, une évaluation des opacités avec la lampe à fente, une classification clinique du cristallin à mydriase maximale, une classification selon le type de cataracte, et des photographies du cristallin par
5 rétroillumination. De plus, des échantillons de sang ont été prélevés au départ, puis en suivi pour les analyses chimiques. L'ensemble a permis d'établir l'état initial des patients avant traitement (définition d'une "ligne de base").

Des suivis d'exams ophtalmiques furent effectués
10 toutes les 2 semaines pendant 2 mois, puis chaque mois. Ils incluaient l'acuité visuelle maximale après correction, des ophtalmoscopies directes et indirectes, un examen à la lampe à fente, et après une dilatation maximale de la pupille (en excluant les glaucomes primaires à angle ouvert), une
15 classification clinique des cristallins, une classification de la cataracte. Ont été prises également des photographies du cristallin observé par rétroillumination ou avec la lampe à fente.

Parallèlement, les changements du cristallin ont été
20 examinés chez tous les patients en utilisant le microscope à la lampe à fente de Zeiss. Les observations photographiques obtenues avec cette technique incluaient un examen initial, des études intermédiaires et un examen final à la fin de la période de traitement.

25 En utilisant la technique de la lampe à fente, le cristallin a été photographié couche par couche afin de visualiser tout le segment antérieur de l'oeil, de la cornée à la capsule postérieure

Avec cette technique, un examen réflexe à la lumière
30 rouge a été réalisé, selon une technique de rétroillumination conventionnelle. Les modifications du cristallin ont par la suite été classées selon la localisation anatomique et l'importance de la modification.

Des opacités corticales ont été évaluées en
35 rétroillumination et photographiées. Le film a ensuite été soumis à une mesure de densitométrie linéaire avec un microdensitomètre. Les valeurs d'opacité ont été reportées en valeur relative en utilisant une gamme d'opacification

étalon. Les mesures d'opacité corticale ont été étalonnées en tenant également compte de la surface totale exposée au rayonnement. Les opacités sub-oculaires postérieures ont été mesurées en rétroillumination par la plus grande hauteur, de la base au sommet, et la plus grande largeur, en utilisant l'échelle de la lampe à fente.

Des photographies du cristallin furent aussi prises sur des opacités nucléaires et corticales et par la suite furent graduées.

Les différents clichés pris avec la lampe à fente ont été analysés à l'aide d'un "tube plumbicon". Cet appareil permet de transposer avec une grande fidélité une mesure d'intensité lumineuse en un signal électrique qui est entré et stocké dans un système d'analyse d'image informative. A l'aide d'un programme spécifique, l'image du cristallin ainsi "numérisée" peut être reproduite sous la forme de graphes à 2 ou 3 dimensions.

Une description détaillée de cette méthode de traitement de l'image est donnée dans l'article de Babizhayev M.A. Zhukotskii A.V. and Sologub A.A. (1992), "Image analysis of the lens opacities induced in developing chick embryo by glucocorticoïd", Exp. Eye Res. 55, 521-537.

Des exemples de ces images reconstruites sont fournies en Annexe 1. Les histogrammes représentés montrent sur un exemple concret l'intérêt d'une telle méthode d'évaluation. Un cas de cataracte subcapsulaire postérieure est étudié avant et après 2 mois et demi de traitement en administration topique (instillations) avec un collyre à 1% de β -alanyl-histamine. Les histogrammes donnent la distribution quantitative des opacités avec un pic d'intégration de $58,44 \pm 18,14$ avant traitement, et $44,95 \pm 8,77$ après 2,5 mois de traitement.

Ces analyses révèlent une régression partielle des opacités dans la région postérico-subcapsulaire du cristallin.

Les résultats obtenus avec cette méthode sont en accord avec les observations cliniques classiques.

Dans cette étude, il a été déterminé différents groupes, à savoir:

un groupe 1 de référence, avec des patients non traités (5 patients, 7 yeux),

5 un groupe 2, auquel il a été administré un collyre qui était un soluté isotonique contenant 1% de β -alanyl-histamine à pH 7,4. Il a été procédé à deux administrations locales par jour (10 patients, 15 yeux)

10 un groupe 3, qui a été soumis au même traitement que le groupe 2, stimulé par un traitement d'attaque durant les deux premières semaines, à savoir: 2 injections sous conjonctivales 2 fois par semaine, de 0,10 et de 0,15 ml du soluté défini pour le groupe 2 (3 patients, 4 yeux)

15 un groupe 4, qui a reçu une administration locale sous forme de collyre d'un soluté isotonique deux fois par jour (5 patients, 7 yeux), le groupe 4 étant comme le groupe 1, un groupe de référence.

Suivant le protocole décrit plus haut, on détermine des valeurs de la densité optique du cristallin en fonction de son opacité, ainsi que l'acuité visuelle, et le tout sur 20 24 mois. En prenant ces deux paramètres, on obtient les tableaux donnant les résultats concernant la modification de l'acuité visuelle au bout de 24 mois en annexe 2, et les résultats concernant la modification de l'opacité visuelle 25 au bout de 24 mois en annexe 3.

On peut conclure que suivant les deux paramètres observés, l'administration du produit est très significative dans l'amélioration de la vision et la régression de la cataracte.

30 De la même façon, on a expérimenté une forme de collyre à base de N-acétyl- β -alanyl-histamine à raison de 1% dans un soluté isotonique, qui donne des résultats conformes au but de l'invention. Avec une seule administration locale quotidienne, les résultats ont été superposables à ceux 35 obtenus précédemment. Ce constat peut être expliqué par une meilleure biodisponibilité de la forme acétylée.

Bien que l'exemple ci-dessus fait état de collyre, on peut administrer le produit selon l'invention sous la forme

de toute formulation oculaire communément acceptée telle qu'un gel ou autre (voir réf. "Remington's pharmaceutical sciences handbook" Hack Pub. Co. USA contenant de 1 à 100 mM de β -alanyl-histamine.

5

Exemple 2

On a mis en évidence l'activité réparatrice sur les muqueuses des produits selon l'invention en utilisant des formulations à de très faibles doses. On a pu étudier cette action sur des gingivo-stomatites d'origines diverses (port de prothèses dentaires mal adaptées, administration par erreur de liquide corrosif, et cobaltothérapie de la sphère-oropharingée).

Dans tous les cas, les causes de la formation et détérioration des muqueuses gingivales et buccales ont été stoppées. En plus des traitements classiques adaptés et administrés systématiquement, il a été remis à 50% des patients, un gel aqueux aromatisé à l'orange contenant 0,28% de N-acetyl-3-phenyl-3-aminopropionyl histamine. Les observations sur ces différents cas ont montré une excellente tolérance et une réduction significative du temps réparateur allant de 20 à 55%.

On peut conclure à une activité positive en respectant la dose de formulation.

25

Exemple 3

On a pu mettre en évidence les propriétés cicatrisantes en utilisant une crème cicatrisante de composition:

30 Nanosphères (diamètre 100nm) contenant
 5% de γ -amino butyryl-histamine.....10g
 Excipient hydrodispersible qsp 100g
 pH 6,5

Cette crème a été appliquée deux fois par jour par légers effleurages sur des cicatrices fermées. Les zones cicatricielles et péri-cicatricielles ont été massées jusqu'à pénétration de la pommade.

35

Les cas étudiés étaient trois cicatrices de moins de 14 mois post-chirurgicales, dont deux avec chéloïdes et cinq séquelles acnéiques

Dans tous les cas, il a été observé une amélioration
5 significative de la cicatrice, une réduction des bourrelets et infractuosités de la peau jusqu'à disparition totale dans deux cas.

En parallèle, il a été noté une restauration d'un
teint uniforme avec disparition des turgescences. Ces
10 résultats sont significativement positifs.

Exemple 4

Le collyre suivant a été utilisé pour le traitement
de lésions de la cornée et en particulier sur une pathologie
15 de "l'oeil sec".

Liposomes de phosphatidylcholine 8 mg/ml
Fibronectine de plasma humain 10 µg/ml
B-alanyl-histamine..... 25 µg/ml

20

dans un milieu tamponné à pH compris entre 6,2 et 7,4

La fibronectine et la B-alanyl-histamine sont
encapsulés dans les liposomes.

25 La fibronectine est une molécule d'attachement cellulaire qui va favoriser la cicatrisation et la restauration du film lacrymal.

Le collyre est appliqué à la surface de l'oeil
pendant 10 jours à raison de deux instillations par jour. La
30 quantité appliquée doit être suffisante pour former un film continu à la surface de l'oeil.

Résultats:

La formule reconstitue durablement une couche
35 protectrice à la surface de l'oeil, comme le met en évidence une étude de rétention sur la cornée d'un marqueur fluorescent (protocole extrait de: R.F. Barber, P.N. Shek "Liposomes and tear film .1. Release of vesicle entrapped

carboxyfluorescein" - Biochimica Biophysica Acta: lipids and lipid metabolism, vol. 879 (L81), n°2 (1986), p. 157-163).

La cicatrisation est suivie à l'aide d'une lampe à fente: on observe une rapide reconstitution de l'épithélium cornéen.

Exemple 5

La pommade utilisée dans cet exemple a également été utilisée pour le traitement des brûlures de 1° et 2° degré superficiel.

	acide parahydroxycinnamique	0,1 g
	essence de menthe	0,3 g
	essence de lavande	0,5 g
	menthol nanosphérisé	0,05g
15	β -aminoisobutyryl-histamine	0,5 g
	excipient hydrodispersible qsp	100 g

Dès l'apparition de la brûlure, on applique la pommade en fine couche. On répète l'application toutes les heures dans un premier temps, jusqu'à cessation de la douleur. Sur les brûlures du 1er degré, l'érythème disparaît rapidement. Sur les brûlures du 2ème degré superficielles avec flyctènes et œdème sur épiderme rougi suivant la surface brûlée, on observe une résorption de l'œdème dans les 2 heures, une régression de la douleur dans les 3 ou 4 heures.

Dans les deux à trois jours qui suivent, les tissus sous-jacents sont régénérés plus rapidement. Il est possible de libérer les vésicules du liquide retenu par ces dernières avec formation d'une nouvelle couche épidermique et élimination des tissus morts. On note une accélération de la réparation épidermique, d'une part, et une excellente qualité, d'autre part.

Exemple 6

L'activité antiradicalaire des produits pseudo-dipeptides de l'invention a été mise en évidence dans l'exemple suivant de formulation cosmétique utilisable comme lotion after-shave:

6-aminocaproyl-histamine nanosphérisé à 5% 16 g

excipient liquide parfumé
hydroalcoolique 6° qsp 100 g
une application régulière après rasage permet de conserver
une peau en bon état.

5

Exemple 7

En se basant sur la même activité que l'exemple ci-dessus, une crème solaire a été réalisée avec la formulation suivante:

10 3 phényl-3-aminopropionyl-histamine 1g
excipient hydrolipidique microdispersé qsp 100g

Différents cas ont été étudiés dans les salons esthétiques lors de séances d'irradiation UVB. Pour des hâles équivalents, lorsque l'on applique la crème après exposition, 15 l'épiderme présente une meilleure qualité dans les jours qui suivent les irradiations.

Exemple 8

20 Toujours basée sur la même activité, on a réalisé une crème entretien visage de composition suivante:

solution de 5-aminovaleryl histamine
nanosphérisée à 4% 20g
ion Cu++,Fe++ (sous forme d'acétylméthionine)
excipient hydrodispersible qsp 100g
25 pH 6,5

Comme crème antiviellissement, avec deux applications quotidiennes, on a noté une régression des ridules, une peau plus souple et plus colorée.

30 Comme crème d'entretien réparatrice des agressions diverses, une application quotidienne suffit. On applique la crème par massage jusqu'à absorption totale, les Nanosphères vont former un film homogène avec libération prolongée. Un maquillage est tout à fait possible après l'application de cette crème.

35 On observe au niveau de la peau du visage, des résultats visibles stimatisés par les critères dits de bonne santé, souplesse, éclat, couleur uniforme et bonne hydratation.

Exemple 9

Les produits pseudo-dipeptides peuvent aussi être utilisés pour protéger des huiles cosmétiques facilement oxydables, riches en acides gras insaturés formulées en cosmétique ou diététique.

Il a été nécessaire d'ajouter 15 à 25 mmol par litre d'huile de produits pseudo-dipeptides de l'invention selon la formulation suivante:

20 mmol de β -alanyl-histamine acétylée
huile extraite de micro algues cultivées en eau de mer très riches en acides gras insaturés, dont EPA qsp pour 1 l

On a comparé le vieillissement de cette huile protégée à l'huile non protégée au bout d'un mois par le dosage de la malondialdéhyde. Pour l'huile non protégée, on observe une augmentation importante de la teneur en dialdéhyde, ce qui prouve bien l'activité de la β -alanine histamine acétylée dans la protection contre l'oxydation.

20

Exemple 10

Selon le même principe que précédemment on a préparé l'huile cosmétique suivante

25 mmol de 8-amino-octanoyl histamine
huile de rosa mosqueta qsp pour 1 l

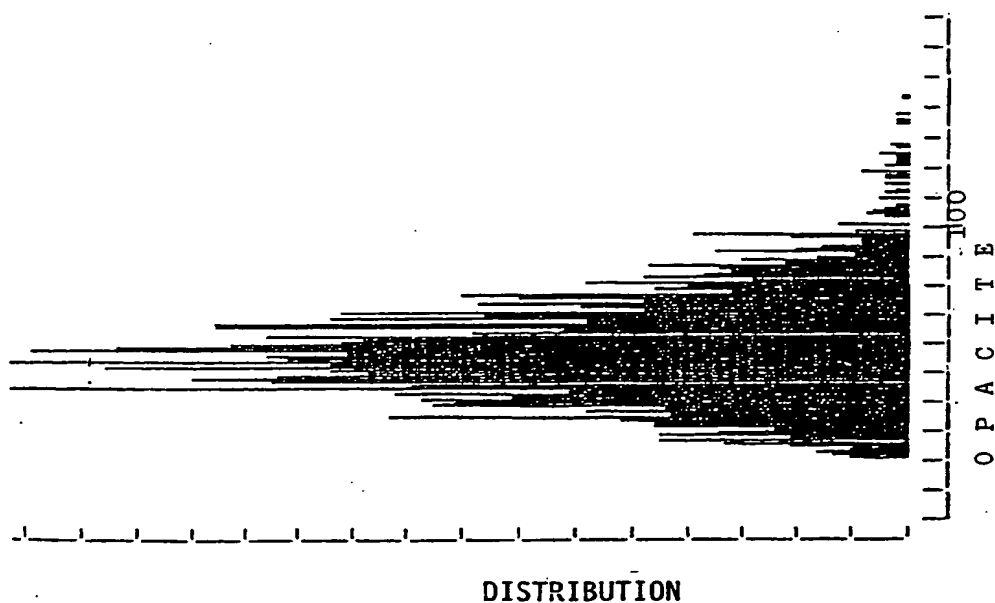
On a comparé les produits huile protégée/huile non protégée au bout de 5 semaines par la mesure de l'indice d'acide. Le dosage de ce dernier, dans ce cas présente une augmentation significative (valeur supérieure à 10 pour l'huile non protégée). On peut donc en conclure que la présence de 8-amino-octanoyl histamine a une action antioxydante sur l'huile de rosa mosqueta.

Tous les exemples ci-dessus ont montré que les pseudo-dipeptides selon l'invention sont actifs dans une fourchette de 1 à 100 millimoles d'actifs par litre avec un pic principal de 10 à 25 mM.

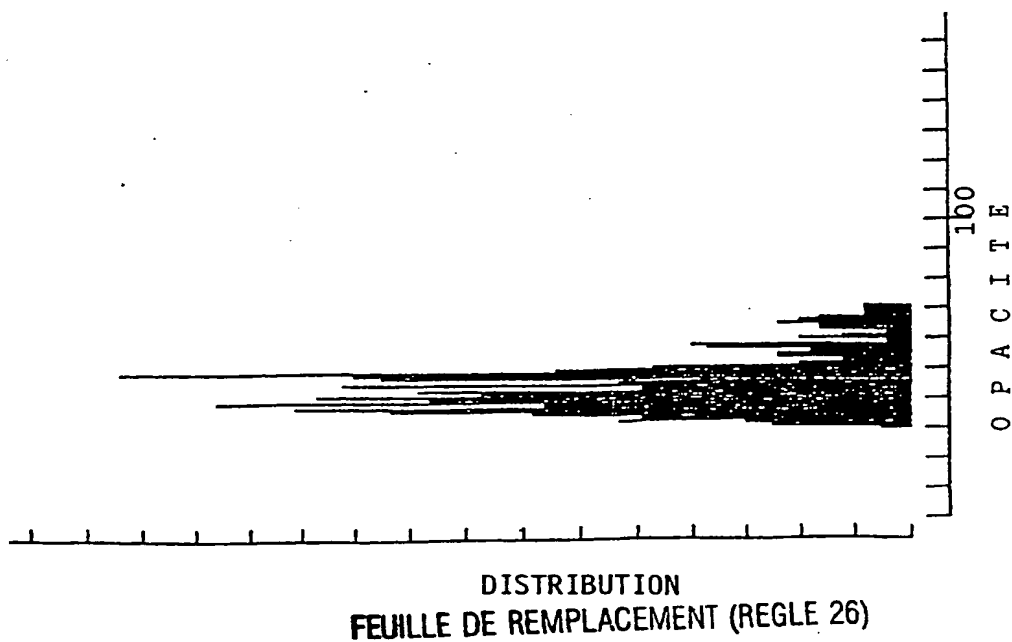
ANNEXE 1

DISTRIBUTION QUANTITATIVE DE L'OPACITE

AVANT



APRES



ANNEXE 2

MODIFICATION DE L'ACUITE VISUELLE AU BOUT DE 24 MOIS

TABLEAU 1

PATIENTS NON TRAITES et TRAITES avec PLACEBO (Groupe 1 et 4)								
Acuité visuelle de départ	Nombre de yeux	AMELIORATION de L'ACUITE VISUELLE			ETAT STATIONNAIRE	DETERIORATION DE L'ACUITE VISUELLE		
		+	++	+++		+	++	+++
20/25	2	-	-	-		-	2	-
20/30	1	1	-	0		-	-	-
20/40	3	-	-	-		1	1	1
20/50	1	-	-	0		-	-	1
20/60	2	-	-	-		1	-	1
20/70	1	-	-	0		-	1	-
20/100	0	-	-	-		-	-	-
20/200	3	1	-	-		-	1	1
< 20/200	1	-	-	-		-	-	1
	14	2	0	0		2	5	5

TABLEAU 2

PATIENTS TRAITES (Groupe 2 et 3)								
Acuité visuelle de départ	Nombre de yeux	AMELIORATION de L'ACUITE VISUELLE			ETAT STATIONNAIRE	DETERIORATION DE L'ACUITE VISUELLE		
		+	++	+++		+	++	+++
20/25	1	1	-	-		-	-	-
20/30	5	1	4	-		-	-	-
20/40	4	1	3	-		-	-	-
20/50	2	1	1	-		-	-	-
20/60	-	-	-	-		-	-	-
20/70	2	1	1	-		-	-	-
20/100	4	-	1	2		-	1	-
20/200	1	-	1	-		-	-	-
< 20/200	0	-	-	-		-	-	-
	19	5	11	2		0	1	0

ANNEXE 3

MODIFICATION DE L'OPACITE VISUELLE AU BOUT DE 24 MOIS

TABLEAU 1

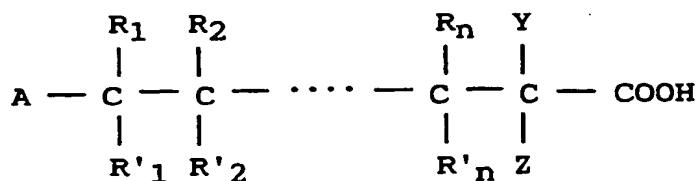
PATIENTS NON TRAITES et TRAITES avec PLACEBO (Groupe 1 et 4)			
% DE MODIFICATION	DIMINUTION DE L'OPACITE	ETAT STATIONNAIRE	AUGMENTATION DE L'OPACITE
5 à 9%	-	-	8
10 à 14%	-	-	2
15 à 19%	1	-	2
20 à 24%	-	-	0
+ 25%	-	-	1
	1	-	13

TABLEAU 2

PATIENTS TRAITES (Groupe 2 et 3)			
% DE MODIFICATION	DIMINUTION DE L'OPACITE	ETAT STATIONNAIRE	AUGMENTATION DE L'OPACITE
5 à 9%	3	-	-
10 à 14%	5	-	-
15 à 19%	5	-	-
20 à 24%	1	-	-
+ 25%	5	-	-
	19	-	-

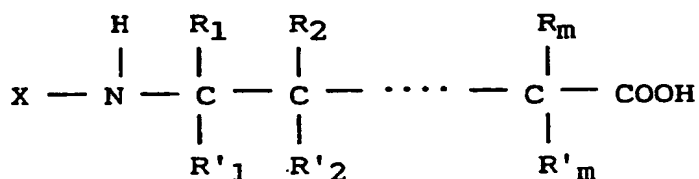
REVENDEICATIONS

1. Produit pseudo-dipeptide obtenu par couplage entre l'histamine ou l'histamine méthyl-substituée et un acide aminé ayant pour formule:



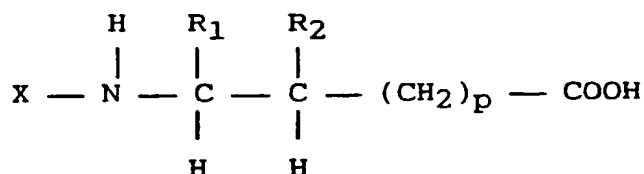
10 dans laquelle A représente un radical choisi dans le groupe consistant en radicaux amines, amides, lactames, uréthanes; $R_1, R'_1, R_2, R'_2, \dots, R_n, R'_n$ représentent chacun un atome d'hydrogène, un radical hydrocarboné ou un groupement fonctionnel tel qu'une fonction alcool, carboxyle ou thiol, 15 une fonction amine, un radical alcoxy ou thioéther, un groupement sulfate ou phosphate; Y et Z représentent chacun un atome d'hydrogène ou de fluor, ou un radical hydrocarboné pouvant être substitué par un ou plusieurs groupements fonctionnels, et n est un entier supérieur ou 20 égal à 1, la liaison covalente avec l'histamine ou l'histamine méthyl-substituée étant une liaison peptidique entre le radical carboxylique de l'acide aminé et le radical amine de l'histamine.

2. Produit pseudo-dipeptide selon la revendication 25 1 caractérisé en ce qu'il a pour formule:



30 dans laquelle X représente un atome d'hydrogène ou un groupe acétyle, et m est un nombre entier supérieur ou égal à 2.

3. Produit pseudo-dipeptide selon la revendication 35 2 caractérisé en ce que l'acide aminé a pour formule:



5

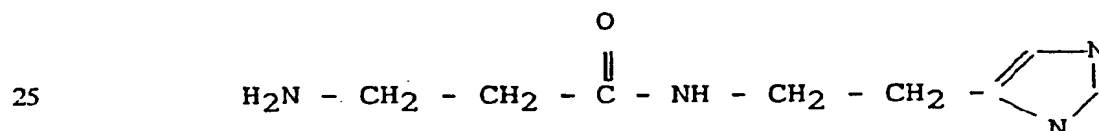
dans laquelle R_1 est un atome d'hydrogène ou un radical phényle, R_2 est un atome d'hydrogène ou un radical méthyle, et p est un nombre entier supérieur ou égal à 0 et inférieur ou égal à 3.

10

4. Produit selon la revendication 2 caractérisé en ce que ledit acide aminé est choisi dans le groupe consistant en β -alanine, acide γ -aminobutyrique, acide β -amino-isobutyrique, acide 5-aminovalérique, acide 3-phényl-3-aminopropionique, acide 6-aminocaproïque, acide 8-aminocaproïque, acide N-acétyl- β -alanine, acide N-acétyl-3-phényl-3-aminopropionique, acide 4-méthyl-aminobutyrique, acide DL- β -aminobutyrique, et acide L-glutamique.

15

5. Produit pseudo-dipeptide selon la revendication 2 caractérisé en ce que X, R_1 et R_2 représentent un atome d'hydrogène et $m = 0$, ledit acide aminé étant de la β -alanine, et le produit pseudo-dipeptide obtenu étant la β -alanyl-histamine de formule:



25

6. Produit pseudo-dipeptide selon la revendication 1, 2 ou 3 caractérisé en ce que l'atome d'oxygène du groupement carbonyle résultant du couplage entre l'histamine et l'acide aminé est remplacé par un atome de soufre.

30

7. Procédé chimique de préparation du produit selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisé par les étapes suivantes:

35

- on rend ledit acide aminé N-protégé par un groupement X,

- on rend ledit acide aminé O-activé par un groupement Y,

- on couple ledit acide aminé N-protégé et O-activé avec l'histamine ou l'histamine méthyl-substituée, et

5 - on élimine X ou non selon le produit pseudo-dipeptide utilisé

8. Procédé selon la revendication 7 caractérisé en ce que l'acide aminé est rendu O-activé par estérification de la fonction carboxylique dudit acide aminé.

10 9. Procédé selon la revendication 8 caractérisé en ce que l'étape d'estérification pour rendre l'acide aminé O-activé est réalisée par la réaction avec un composé choisi dans le groupe consistant en: alcool de cyanométhyle, o-nitrophénol, 2,4,5-trichlorophénol, p-
15 nitrophénol, 2,4-dinitrophénol, pentachlorophénol, pentafluorophénol, N-hydroxyphtalimide, N-hydroxysuccinimide, 1-hydroxypipéridine et 5-chloro-8-hydroxy-quinoline.

20 10. Procédé selon la revendication 7, 8 ou 9 caractérisé en ce que le produit pseudo-dipeptide est de la β -alanyl-histamine préparée de la façon suivante:

370 mg de chlorhydrate d'histamine (2 mmol) sont dissous dans 7 ml de diméthylformamide (DMF),

0,56 ml de triéthylamine (4 mmol) et 800 mg de N-
25 terbutyloxycarbonyl- β -alanine pentafluorophényl-ester (2,25 mmol) sont ajoutés au mélange,

le mélange est agité 30 minutes à 0°C puis 3 heures à température ambiante,

30 le résidu est filtré puis lavé avec du diméthylformamide,

le diméthylformamide est évaporé sous vide,

de l'éther est ajouté au résidu et le composé huileux N-terbutyloxycarbonyl- β -alanyl-histamine est recueilli par décantation,

35 le chlorhydrate de β -alanyl-histamine est ensuite obtenu par traitement du N-terbutyloxycarbonyl- β -alanyl-

histamine par de l'acide chlorhydrique en solution dans l'acide acétique pendant 30 minutes,

l'acide acétique est partiellement évaporé sous vide et de l'éther est rajouté au résidu,

5 le résidu est alors filtré,

la recristallisation par le système éthanol/méthanol (50/50)- éther éthylique conduit à l'obtention de 300 mg de chlorhydrate de β -alanyl-histamine, et

10 la β -alanyl-histamine base est obtenue par passage du chlorhydrate correspondant sur des résines.

11. Procédé enzymatique de préparation du produit selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisé en ce qu'il consiste à coupler l'acide aminé avec l'histamine ou
15 l'histamine méthyl-substituée en présence d'un catalyseur enzymatique du type hydrolase.

12. Procédé selon la revendication 11 caractérisé en ce que ledit catalyseur enzymatique est une hydrolase choisie dans le groupe consistant en lipases extraites de
20 micro-organismes ou d'origine animale, et en protéases.

13. Procédé selon la revendication 11 ou 12 caractérisé par les étapes suivantes:

on rend l'acide aminé N-protégé par un groupement X

on rend l'acide aminé O-activé par un groupement Y,

25 on couple l'acide aminé N-protégé et O-activé avec l'histamine ou l'histamine méthyl-substituée en présence dudit catalyseur, et

on élimine le groupement X selon le produit pseudo-dipeptide utilisé.

30 14. Procédé selon la revendication 13 caractérisé en ce que l'acide aminé est rendu O-activé par estérification de la fonction carboxylique dudit acide aminé.

15. Procédé selon la revendication 14 caractérisé
35 en ce que l'étape d'estérification pour rendre l'acide aminé O-activé est réalisée par la réaction avec un composé choisi dans le groupe consistant en alcools aliphatiques ou

alcools aromatiques en excluant les alcools tertiaires, et comprenant notamment l'éthanol, les halogéno-alkylalcools tels que 2,2,2-trichloro-éthanol, le phénol, l'alcool de cyanométhyle, l'o-nitrophénol, le 2,4,5-trichlorophénol, le p-nitrophénol, le 2,4-dinitrophénol, le pentachlorophénol, le pentafluorophénol, la N-hydroxyphtalimide, la N-hydroxysuccinimide, la 1-hydroxypipéridine et la 5-chloro-8-hydroxy-quinoline.

16. Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 15 caractérisé en ce que le produit pseudo-dipeptide est de la N-acétyl- β -alanyl-histamine obtenue par les étapes suivantes:

- 2,38 g (15 mmoles) de N-acétyl- β -alanine éthyl ester et 1,11 g (10 mmoles) d'histamine sont dissous dans 40 ml d'un mélange tert-amylalcool-heptane (25:75),
- 0,5 g de lipase Amano P (*Pseudomonas* sp.) sont ajoutés et la suspension est chauffée à 40°C, sous agitation jusqu'à disparition complète de l'histamine,
- la lipase est récupérée par filtration,
- le solvant de tert-amylalcool-heptane est évaporé sous vide pour donner un composé huileux, et
- le résidu obtenu est trituré dans l'éther éthylique afin d'éliminer l'excès de N-acétyl- β -alanine éthylester, et obtenir environ 1,9 g de N-acétyl- β -alanyl-histamine.

17. Application du produit selon l'une des revendications de 1 à 6 pour obtenir un médicament destiné à soigner la cataracte.

18. Médicament résultant de l'application selon la revendication 17 administré sous forme d'une formulation oculaire communément acceptée telle que collyre ou gel.

19. Médicament résultant de l'application selon la revendication 17, administré sous forme d'injections sous conjonctivales contenant environ 1% de β -alanyl-histamine.

20. Application du produit selon l'une des revendications 1 à 6 pour obtenir un médicament destiné à soigner l'athérosclérose.

21. Application du produit selon l'une des revendications 1 à 6 pour obtenir un médicament destiné à soigner les divers états inflammatoires associés au stress oxydatif.

5 22. Application du produit selon l'une des revendications 1 à 6 pour obtenir un médicament destiné à soigner les maladies de la peau associées au stress oxydatif telles que la photoallergie, la porphyrie, et le Lupus Erythémateux.

10 23. Application du produit selon l'une des revendications 1 à 6 pour obtenir un médicament destiné à la cicatrisation des tissus tels que les tissus cutanés, les ulcères gastriques et les tissus oculaires.

15 24. Médicament résultant de l'application selon la revendication 23 administré sous forme de collyre pour le traitement de lésions de la cornée et en particulier sur une pathologie de "l'oeil sec".

25. Médicament selon la revendication 24 ayant la composition suivante:

20 Liposomes de phosphatidylcholine 8 mg/ml
Fibronectine de plasma humain 10 µg/ml
B-alanyl-histamine 25 µg/ml

25 26. Application du produit selon l'une des revendications 1 à 6 pour obtenir un médicament anti-allergie.

30 27. Application du produit selon l'une des revendications 1 à 6 pour obtenir une composition thérapeutique ou cosmétique destinée à la régénération et au rajeunissement des tissus tels que les muqueuses et les tissus cutanés.

35 28. Application du produit selon l'une des revendications 1 à 6 pour la conservation et la stabilisation de substances sensibles à l'oxydation, de matières alimentaires ou d'organes et de tissus conservés ex vivo.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Application No
PCT/FR 94/00189A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 5 C07D233/54 A61K31/415 A61K7/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 5 C07D A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 111, no. 19, 1989, Columbus, Ohio, US; abstract no. 167340h, M. A. BABIZHAYEV 'Antioxidant activity of L-carnosine, a natural histidine-containing dipeptide in crystalline form' page 74 ; see abstract & BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA vol. 1004, no. 3 , 1989 pages 363 - 371 --- -/--	1,17

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 May 1994

Date of mailing of the international search report

27.05.94

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Alfaro Faus, I

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BULLETIN OF THE CHEMICAL SOCIETY OF JAPAN Vol. 54 , 1981 , TOKYO JP pages 1101 - 1104 M. NANASAWA ET AL. 'Models for visual pigments. The effect of the imidazolyl group on the absorption maxima of the retinal Schiff base' see page 1102, column 1, lines 23- 25, compound 8	1
P,A	--- WO,A,93 04690 (PEPTIDE TECHNOLOGY) 18 March 1993 see page 10, lines 9 - 12; page 24, lines 6 - 16; claim 1 -----	1,17,20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 94/00189

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9304690	18-03-93	NONE	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 5 C07D233/54 A61K31/415 A61K7/48

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 5 C07D A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 111, no. 19, 1989, Columbus, Ohio, US; abstract no. 167340h, M. A. BABIZHAYEV 'Antioxidant activity of L-carnosine, a natural histidine-containing dipeptide in crystalline form' page 74 ; voir abrégé & BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA vol. 1004, no. 3 , 1989 pages 363 - 371 --- -/--	1,17

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

19 Mai 1994

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

27. 05. 94

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Alfaro Faus, I

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	BULLETIN OF THE CHEMICAL SOCIETY OF JAPAN vol. 54 , 1981 , TOKYO JP pages 1101 - 1104 M. NANASAWA ET AL. 'Models for visual pigments. The effect of the imidazolyl group on the absorption maxima of the retinal Schiff base' voir page 1102, colonne 1, lignes 23 - 25, composé 8 ---	1
P,A	WO,A,93 04690 (PEPTIDE TECHNOLOGY) 18 Mars 1993 voir page 10, lignes 9 - 12; page 24, lignes 6 - 16; revendication 1 -----	1,17,20

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Der Internationale No

PCT/FR 94/00189

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9304690	18-03-93	AUCUN	

Formulaire PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (juillet 1992)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.